

PCT/CZ98/00019  
27.04.98

5

ČESKÁ REPUBLIKA

REC'D	2 2 MAY 1998
WIPO	PCT

ÚŘAD PRŮMYSLUVÉHO VLASTNICTVÍ

potvrzuje, že

VÚFB a.s., Praha, CZ

podal dne 30. dubna 1997 (30.04.97)

příhlášku vynálezu

značky spisu PV 1315-97

a že připojený popis a 0 výkresů se shoduje úplně s původně podanými  
přílohami této přihlášky vynálezu.

**PRIORITY DOCUMENT**

Za předsedu: Ing. Marta Hošková

*Marta Hošková*



V Praze dne 18. května 1998 (18.05.98)

9

Oligopeptidické inhibitory elastáz

č.j.	033315
došlo	30. IV. 97
UŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ PŘÍL.	

### Oblast techniky

Vynález se týká oligopeptidických inhibitorů elastáz, zvláště pak leukocytární elastázy (LE). Elastolytické enzymy, např. LE anebo pankreatická elastáza (PE) náleží k serinovým proteinázám, které narušují (degradují) přírodní substrát elastin; elastin tvoří podstatnou část bílkovinné hmoty organismu. Ve zdravém organismu je tato destrukční aktivita inhibována endogenními enzymy, např.  $\alpha_1$ -proteinázovým inhibitorem ( $\alpha_1$ -PI). V případě nedostatku  $\alpha_1$ -PI z různých příčin (infekce, výživa, pracovní prostředí, dědičnost) nastává autodigestce životně důležitých orgánů LE a PE a tím ku vzniku společenských závažných chorob, jakou je např. akutní pankreatitida, plicní emfyzém, artritida nebo gingivitida.

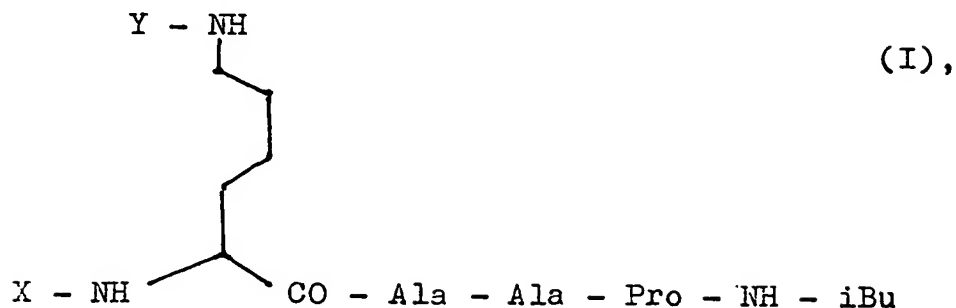
### Dosavadní stav techniky

Jednou z možností dosáhnout homoestáze, tj. rovnováhy mezi elastázou a odpovídajícím endogenním inhibitorem (v případě patogenního stavu), je substituční terapie, tj. aplikace exogenního přírodního anebo syntetického inhibitoru typu  $\alpha_1$ -PI. Tento způsob je prakticky prováděn aplikací  $\alpha_1$ -PI, jednak přírodního (Antilysin<sup>R</sup>, Trasylol<sup>R</sup>, Contrykal<sup>R</sup>) anebo např. syntetického inhibitoru typu Nafamstat mesylát, FUT (Tori Co, Tokyo, Japan). V nedávné minulosti původci navrhli syntetický účinný inhibitor v terapii akutní pankreatitidy Glt-Ala<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>, Inpankin VÚFB 16834 (Gut 33, 701-706 (1992)).

Vážným nedostatkem izolovaných (přírodních) inhibitorů je jejich antigenita, ( $\alpha_1$ -PI je druhově specifický) ale i event. kontaminace boviní spongiformní encefalopatií (BES). Naopak syntetické nízkomolekulární inhibitory postrádají tyto vedlejší účinky, jsou účinnější a stabilnější. Jejich chemická struktura je přesně definována a charakterizována, chemicky i fyzikálně.

# Podstata vynálezu

Vynález se týká oligopeptidických inhibitorů elastáz obecného vzorce I



kde X značí A nebo B, přičemž A se liší od B,  
Y značí A nebo B nebo A-Ala, přičemž A se liší od B,  
a je-li A-Ala, pak X značí B,  
A značí nasycenou kyselinu s 8 až 16 atomy uhlíku,  
B značí zbytek 3-karboxypropionylu nebo 4-karboxybutyroylu.

Sloučeniny obecného vzorce I jsou účinné kompetitivní inhibitory serinových proteináz, zvláště pak leukocytární elastázy (LE) a pankreatické elastázy (PE). Tyto enzymy destruktivně poškozují buněčné a cévní stěny a jsou příčinou závažných onemocnění. Vedle nejčastěji sledovaného plicního emfyzému, akutní pankreatitidy, různých typů artritid, jsou to hemoragické záněty periodontu; proto jednou z atraktivních aplikací je použití těchto sloučenin jako přísady do různých dentálních přípravků, např. zubních past, zubních ústních vod. Zvláště zajímavou aplikací je použití těchto účinných inhibitorů jako přísad do zubních žvýkacích gum; přísady v těchto medicínálních přípravcích zaručují konstantní hladinu účinného inhibitoru v ústní dutině i v denním pracovním režimu, kdy z časových a pracovních důvodů není možné zubní chrup spolehlivě hygienicky ošetřit standardním způsobem (kartáčkem a zubní pastou).

Zcela v neposlední řadě je potenciální uplatnění inhibitorů LE při bloádě aktivace pro-enzymů, např. katepsinu B (Biochim. Biophys. Acta 1226, 117-125 (1994) anebo inhibici matrix metaloproteinázy 3 (MMP-3) tzv. stromelysinu z odpovídajícího zymogenu (FEBS Lett. 249, 353-356 (1989)). MMP-3 je známa jako klíčový enzym v patogenezi maligního onemocnění a roz<sup>ř</sup>oušené sklerozy (sclerosis multiplex).

Protože účinné inhibitory jsou syntetizovány výhradně z fyziologických, tudíž netoxických komponent, tj. aminokyselin (alaninu, prolinu a lysinu) vyšších mastných kyselin a kyseliny jantarové či glutarové, jsou dostatečné záruky jejich zdravotní nezávadnosti.

Sloučeniny obecného vzorce I lze používat ve formě volných kyselin, resp. z důvodů vyšší rozpustnosti ve formě rozpustných solí, např. s alkalickými kovy, zejména sodnou.

Syntéza oligopeptidických inhibitorů elastázy podle vynálezu včetně všech meziproduktů, je vyznačena schématy 1, 2 a 3. Konečné sloučeniny a meziprodukty jsou charakterizovány teplotou tání (t.t.), případně optickou rotací anebo i chromatografií na tenké vrstvě (TLC) a hodnoty jsou vyznačeny v tabulkách I až VI.

Klíčovou sloučeninou pro syntézu všech oligopeptidických inhibitorů je isobutylamid alanyl-alanyl-prolinu (Collection Czechoslov. Chem. Commun. 52, 3034-3041 (1987); acylace aminokyselin vyššími mastnými zbytky je popsána v patentovém spise č. CS 280 726. Vlastní syntéza meziproduktů a konečných látek je provedena syntézou v roztoku a je zřejmá z příkladů provedení. Hodnocení (stanovení inhibičních konstant  $K_i$ ) lidskou leukocytární elastázou bylo provedeno známým způsobem (Biol. Chem. Hoppe-Seyler 366, 333-343 (1985)) a výsledky stanovení některých sloučenin jsou vyznačeny v tabulce VII.

Použité zkratky a symboly mají následující význam:

Ala = alanin  
Pro = prolin  
Lys = lysin  
Suc = sukcinyl  
Glt = glutaryl

Kpl = kaproyl  
Lau = lauroyl  
Myr = myristoyl  
Pal = palmitoyl

Z = benzyloxykarbonyl  
Boc = tert.butyloxykarbonyl  
iBu = isobutyl  
AcOH = kyselina octová  
DMFA = dimethyformamid  
AcOEt = octan ethylnatý  
DCCI = N,N'-dicyklohexylkarbodiimid  
OHSuc = N-hydroxysukcinimid  
EtO-CO-Cl = chlormravenčan ethylnatý

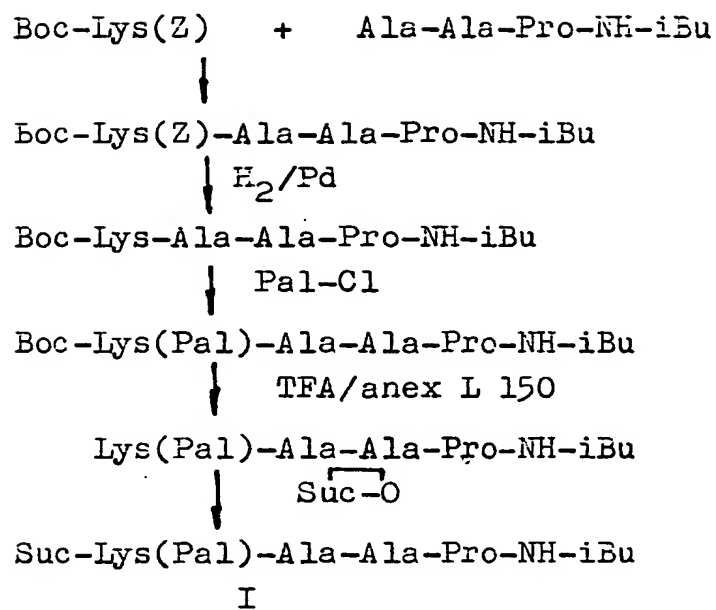
$\overline{\text{Suc} - \text{O}}$  = anhydrid  
kyseliny jantarové

Standardní způsob přípravy: surový reakční produkt se rozpustí v AcOEt a postupně se vytřepe 1% kyselinou citronovou, vodou, 5%  $\text{NaHCO}_3$ , vodou, vysuší bezvodým  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a odpaří. Veškerá odpařování se prováděla za sníženého tlaku na rotační vakuové odparce.

Chromatografie na tenké vrstvě (TLC- silikagel G) byla provedena v soustavě  $S_1$ : n-butanol - kyselina octová - voda (4 : 1 : 1)

Optická rotace byla změřena na polarimetru Perkin-Elmer 141. T.t. byly stanoveny na Koflerově bloku a nebyly korigovány.

Schema 1



Schema 2

A - Lys(Z) - Ala - Ala - Pro - NH - iBu

↓ H<sub>2</sub>/Pd II(a-d)

A - Lys - Ala - Ala - Pro - NH - iBu

↓  $\overbrace{\text{M} - \text{O}}$  III(a-d)

A - Lys(M) - Ala - Ala - Pro - NH - iBu

IV(a-h)

II, III	A
a	Kpl
b	Lau
c	Myr
d	Pal

IV	A	M
a	Kpl	Suc
b	Lau	Suc
c	Myr	Suc
d	Pal	Suc
e	Kpl	Glt
f	Lau	Glt
g	Myr	Glt
h	Pal	Glt

Schema 3

Boc - Lys - Ala - Ala - Pro - NH - iBu



Boc - Lys(B) - Ala - Ala - Pro - NH - iBu

V(a-d) ↓ 1) HCl/AcOH 2) anex (Zerolit)

Lys(B) - Ala - Ala - Pro - NH - iBu

VI(a-d) ↓ Suc - O

Suc - Lys(B) - Ala - Ala - Pro - NH - iBu

VII(a-d)

V, VI, VII	B
a	Kpl-Ala
b	Lau-Ala
c	Myr-Ala
d	Pal-Ala



Tabulka I

II(a-d)	T.t. °C
a Kpl-Lys(Z)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	205-208
b Lau-Lys(Z)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	188-190
c Myr-Lys(Z)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	178-181
d Pal-Lys(Z)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	169-172

Tabulka II

III(a-d)	T.t. °C
a Kpl-Lys-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	177-181
b Lau-Lys-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	183-185
c Myr-Lys-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	173-176
d Pal-Lys-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	154-158

Tabulka III

IV(a-h)	T.t. °C
a Kpl-Lys(Suc)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	141-144
b Lau-Lys(Suc)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	143-145
c Myr-Lys(Suc)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	148-151
d Pal-Lys(Suc)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	142-144
e Kpl-Lys(Glt)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	126-128
f Lau-Lys(Glt)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	152-155
g Myr-Lys(Glt)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	147-150
h Pal-Lys(Glt)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	124-126

Tabulka IV

V(a-d)	T.t. °C
a Boc-Lys(Kpl-Ala)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	179-182
b Boc-Lys(Lau-Ala)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	181-184
c Boc-Lys(My-Ala)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	133-135
d Boc-Lys(Pal-Ala)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	146-150

Tabulka V

VI(a-d)		T.t. °C
a	Lys(Kpl-Ala)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	185-188
b	Lys(Lau-Ala)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	189-191
c	Lys(Myr-Ala)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	184-187
d	Lys(Pal-Ala)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	158-161

Tabulka VI

VII(a-d)		T.t. °C
a	Suc-Lys(Kpl-Ala)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	182-186
b	Suc-Lys(Lau-Ala)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	188-189
c	Suc-Lys(Myr-Ala)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	181-184
d	Suc-Lys(Pal-Ala)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	171-174

Tabulka VII

Inhibiční konstanty (Ki) lidské leukocytární elastasy

IIIa	Kpl-Lys-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	$2,27 \cdot 10^{-5}$ M
IVa	Kpl-Lys(Suc)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	$4,50 \cdot 10^{-6}$ M
IVb	Lau-Lys(Suc)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	$5,32 \cdot 10^{-6}$ M
IVc	Myr-Lys(Suc)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	$6,82 \cdot 10^{-6}$ M
IVe	Kpl-Lys(Glt)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	$9,96 \cdot 10^{-6}$ M
IVf	Lau-Lys(Glt)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	$7,35 \cdot 10^{-6}$ M
IVh	Pal-Lys(Glt)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	$1,46 \cdot 10^{-5}$ M
Vib	Lys(Lau-Ala)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	$5,38 \cdot 10^{-7}$ M
VIIb	Suc-Lys(Lau-Ala)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	$6,92 \cdot 10^{-7}$ M
VId	Lys(Pal-Ala)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	$2,47 \cdot 10^{-5}$ M
VIIId	Suc-Lys(Pal-Ala)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu	$1,19 \cdot 10^{-5}$ M

## Příklady provedení

### Příklad 1

#### Boc-Lys(Z)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu

K roztoku Boc-Lys(Z) (20 mmolů) a N-Etp (2,8 ml) v DMFA (50 ml) ochlazenému na  $-10^{\circ}\text{C}$  byl přidán EtOCO-Cl (2 ml); po 5 min míchání a chlazení ( $-10^{\circ}\text{C}$ ) byl k reakčnímu roztoku přidán roztok Ala-Ala-Pro-NH-iBu (6,3 g; 20 mmolů) v DMFA (20 ml). Po 30 min míchání při  $0^{\circ}\text{C}$  a 2 h při teplotě místnosti byl reakční roztok odpařen, odparek rozpuštěn ve směsi AcOEt a vody a standardním způsobem I zpracován. Pevný odparek byl krystalován z 2-propanolu a petroletheru. Bylo získáno 5,7 g produktu o t.t.  $168-170^{\circ}\text{C}$ .

#### Boc-Lys-Ala-Ala-Pro-NH-iBu

K roztoku Boc-Lys(Z)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu (3,4 g; 5 mmolů) v methanolu (300 ml) byla přidána suspenze 5% Pd/C (0,3 g) v toluenu (10 ml) a reakční směs byla hydrogenována v autoklavu 20 min při tlaku 2 MPa. Po odfiltrování katalyzátoru byl methanolický roztok odpařen. Bylo získáno 2,8 g o t.t.  $150-153^{\circ}\text{C}$

#### Boc-Lys(Pal)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu

K roztoku Boc-Lys-Ala-Ala-Pro-NH-iBu (1,1 g; 2 mmoly) v DMFA (4 ml) a 1 M NaOH (3,5 ml) bylo při teplotě místnosti přidáno během 30 min <sup>17</sup>Pal-Cl (1 ml); po dalších 30 min míchání byl reakční roztok okyselen 10% AcOH (pH 5) a vyloučená hrubozrnná sraženina byla odfiltrována. Bylo získáno 0,9 g chromatograficky homogenního produktu ( $R_f = 0,71/S_1$ ).

#### Lys(Pal)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu

K roztoku Boc-Lys(Z)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu (390 mg) v AcOH (0,5 ml) byl přidána TFA (0,5 ml). Po 1 h stání při teplotě místnosti byl reakční roztok odpařen a vysušen nad kysličníkem fosforečným. Potom byl získaný trifluoracetát rozpuštěn v methanolu a deionizován na slabě basicím anexu (L 150). Bylo získáno 180 mg produktu (báze) o t.t.  $139-142^{\circ}\text{C}$ ;  $[\alpha]_D^{20} -78,3^{\circ}$  ( $c = 0,2$ ; methanol).

Suc-Lys(Pal)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu

K roztoku Lys(Pal)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu (140 mg; 2 mmoly) v DMFA (20 ml) byl přidán k reakčnímu roztoku anhydrid kyseliny jantarové (25 mg); po 30 min zahřívání při 80 °C byl reakční roztok odpařen a gelovitý odparek byl krystalován z roztoku DMFA a AcOEt. Bylo získáno 60 mg produktu o t.t. 157-160 °C;  $[\alpha]_D^{20}$  -73,5 ° (c = 0,2; methanol).

Příklad 2

Myr-Lys(Z)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu (IIc)

K roztoku Myr-Lys(Z) (5,05 g; 10 mmolů) v DMFA (150 ml) byl přidán HOSuc (1,15 g) v DMFA (20 ml); po ochlazení na 0 °C byl přidán DCCI (2,2 g). Po 1 h míchání a chlazení (0 °C) byl přidán Ala-Ala-Pro-NH-iBu (3,15 g; 10 mmolů) v DMFA (25 ml). Po 12 h stání při teplotě místnosti bylo k reakčnímu roztoku přidáno AcOH (0,2 ml) a reakční suspenze po 30 min uložení při 0 °C byla sfiltrována a promyta DMFA, a odpařen<sup>a</sup>. Gelovitý odparek byl krystalován z horkého DMFA (40 ml). Bylo získáno 4,7 g produktu, o t.t. 178-181 °C. Obdobným způsobem byly připraveny sloučeniny II(a,b,d)

Myr-Lys-Ala-Ala-Pro-NH-iBu (IIIc)

K roztoku Myr-Lys(Z)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu (4 g; 5 mmolů) v methanolu (300 ml) byla přidána suspenze 5% Pd/C (0,3 g) a tlaková hydrogenolyza byla provedena obdobně (2 MPa) jak je uvedeno v příkladě 1. Bylo získáno 2,9 g produktu o t.t. 173-176 °C. Obdobným způsobem byly připraveny sloučeniny III(a,b,d).

Myr-Lys(Suc)-Ala-Ala-Pro-NH-iNH-iBu (IVc)

K roztoku Myr-Lys-Ala-Ala-Pro-NH-iBu (1,35 g; 2 mmoly) v dioxanu (30 ml) byl přidán anhydrid kyseliny jantarové (380 mg) a reakční roztok byl 30 min zahříván pod zpětným chladičem. Po ochlazení bylo získáno 1,75 g produktu o t.t. 148-151 °C. Obdobným způsobem byly získány sloučeniny IV(a,b,d).

Pal-Lys(Glt)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu (IVh)

K roztoku Pal-Lys-Ala-Ala-Pro-NH-iBu (2,05 g; 3 mmoly) v dioxanu (30 ml) byl přidán anhydrid kyseliny glutarové (600 mg) a reakční roztok byl zahříván 30 min pod zpětným chladičem; po ochlazení bylo získáno 2,1 g produktu o t.t. 124-126 °C.  $[\alpha]_D^{20} -34,6^\circ$  (c = 0,2; DMFA). Obdobným způsobem byly připraveny sloučeniny IV(e-g).

Příklad 3

Boc-Lys(Pal-Ala)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu (Vd)

K roztoku Pal-Ala (985 mg; 3 mmoly) v DMFA (25 ml) byl přidán OHSuc (350 mg) a po ochlazení na -5 °C byl k reakčnímu roztoku přidán DCCI (660 mg); po dalších 30 min míchání a chlazení (-5 °C) byl přidán roztok Boc-Lys-Ala-Ala-Pro-NH-iBu (1,65 g; 3 mmoly) v DMFA (30 ml). Po 3 h míchání při teplotě místnosti byla vyloučená sraženina odfiltrována, promyta DMFA a k nekrytalickému odparku byla přidána voda (50 ml). Vyloučená sraženina byla odfiltrována a byla krystalována z 2-propanolu. Bylo získáno 1,75 g produktu o t.t. 146-150 °C. Obdobným způsobem byly získány sloučeniny V(a-c).

Lys(Pal-Ala)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu (VI d)

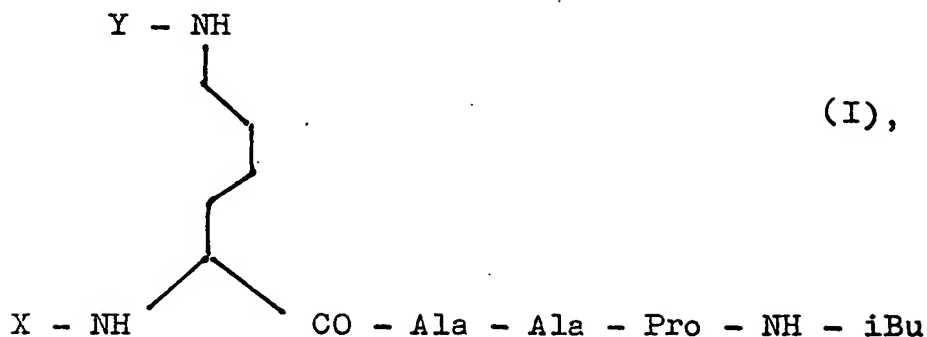
K roztoku Boc-Lys(Pal-Ala)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu (1,7 g; 2 mmoly) v AcOH (20 ml) byl přidán roztok 0,6 M HCl/AcOH (4 ml). Po 3 h stání při teplotě místnosti byl vzniklý hydrochlorid vysrážen etherem, odfiltrován a vysušen nad kyslíč- níkem fosforečným a NaOH. Potom byl hydrochlorid deionizován silně basickým anexem (Zerolit FF/OH-cykl) v methanolu, roztok byl odpařen a pevný odparek byl krystalován z 2-propanolu a petroletheru. Byla získána báze (820 mg) o t.t. 158-161 °C. Obdobným způsobem byly připraveny sloučeniny VI(a-c).

Suc-Lys(Pal-Ala)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu (VIIId)

K roztoku Lys(Pal-Ala)-Ala-Ala-Pro-NH-iBu (750 mg; 1 mmol) v DMFA (20 ml) byl přidán anhydrid kyseliny jantarové (160 mg). Po 2 h míchání při teplotě místnosti byl produkt vysražen přidavkem vody (50 ml) a krystalován z 2-propanolu a AcOEt. Bylo získáno 690 mg konečného produktu o t.t. 171-174 °C. Obdobným způsobem byly připraveny sloučeniny VII(a-c).

# PATENTOVÉ NÁROKY

Oligopeptidické inhibitory elastáz obecného vzorce I

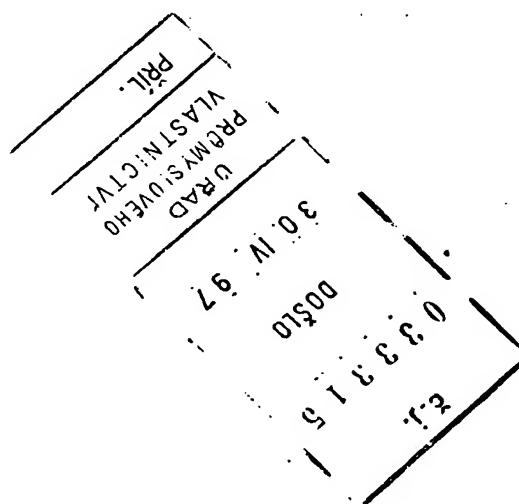


kde X značí A nebo B, přičemž A se liší od B,

Y značí A nebo B nebo A-Ala, přičemž A se liší od B,  
a je-li A-Ala, pak X značí B,

A značí nasycenou kyselinu s 8 až 16 atomy uhlíku,

B značí zbytek 3-karboxypropionylu nebo 4-karboxybutyroylu



**This Page Blank (uspto)**